

PETUNJUK PRAKTIKUM

MIKROBIOLOGI PANGAN



DISUSUN OLEH :

Dr. NANIK SUHARTATIK, STP., MP

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI DAN INDUSTRI PANGAN
UNIVERSITAS SLAMET RIYADI
SURAKARTA**

2024

SAMBUTAN DEKAN

Puji syukur kami haturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena proses belajar-mengajar di Fakultas Teknologi Pertanian telah dapat berjalan dengan lancar. Kegiatan ini tentu saja didukung oleh lengkapnya fasilitas pendukung untuk menunjang kegiatan perkuliahan. Salah satu faktor pendukung bagi suksesnya kegiatan adalah adanya buku panduan praktikum. Buku panduan praktikum merupakan buku panduan bagi mahasiswa untuk melaksanakan praktek di Laboratorium. Praktikum Mikrobiologi Pangan merupakan salah satu jenis mata praktikum yang wajib ditempuh oleh semua mahasiswa di Fakultas Teknologi dan Industri Pangan Universitas Slamet Riyadi Surakarta. Mata praktikum ini penting untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam analisis perubahan mikrobiologi selama proses kerusakan dan pengolahan bahan pangan.

Saya, sebagai Dekan Fakultas Teknologi dan Industri Pangan UNISRI Surakarta, menyambut dengan baik atas selesainya pembuatan buku panduan praktikum “Mikrobiologi Pangan“ ini. Semoga buku ini bermanfaat bagi terlaksananya kegiatan praktikum di FATIPA UNISRI. Saya harap juga, buku panduan ini juga senantiasa diperbaharui sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan.

Surakarta, 27 Mei 2024
Dekan FATIPA,

Dr. Nanik Suhartatik, S.TP., MP

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkah dan rahmat-Nya-lah penulis dapat menyelesaikan buku panduan ini hingga selesai. Buku ini merupakan buku panduan praktikum Mikrobiologi Pangan yang telah dilengkapi dengan beberapa teknik analisis bahan pangan. Analisis yang dipelajari pada mata praktikum ini adalah teknik analisis mikrobiologi yang akan memantau perubahan mikrobial selama proses pembusukan dan akibat pengolahan, seperti penambahan bahan pengawet, pemanasan, pendinginan, dan mikrobiologi air.

Semoga buku panduan ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan. Tentu saja buku panduan ini akan diperbaiki terus-menerus hingga mampu memenuhi kebutuhan para penggunanya, sesuai dengan berkembangnya ilmu-ilmu pengetahuan dan metode analisis bahan makanan.

Terima kasih.

Surakarta, 27 Mei 2024

Penyusun

DAFTAR ISI

Halaman Sampul.....	i
Sambuatn Dekan.....	ii
Kata pengantar.....	iii
Daftar Isi.....	iv
Acara 1. Mikrobiologi Air.....	1
Acara 2. Pengaruh Proses Pengolahan terhadap Kualitas Mikrobia.....	9
Acara 3. Pengujian Aktivitas Antimikrobia	13
Daftar Pustaka	

ACARA 1

MIKROBIOLOGI AIR

A. Pendahuluan

Air merupakan komponen penunjang kehidupan yang sangat vital. Hampir semua aktivitas kehidupan sehari-hari kita selalu menggunakan air. Bahkan untuk kebutuhan masak-memasak juga membutuhkan air. Begitu juga dengan aktivitas dalam produksi bahan pangan skala pabrik (industri). Air merupakan komponen yang sangat berperan dalam menentukan masa simpan produk pangan. Hampir semua aktivitas produksi bahan pangan menggunakan air, mulai dari sortasi bahan baku, pencucian alat, hingga untuk kebutuhan sanitasi pekerja atau area produksi. Alat yang digunakan untuk kebutuhan produksi juga kontak langsung dengan air sehingga mau tidak mau, kita harus menggunakan air yang berkualitas. Karena apabila kita menggunakan air yang tidak berkualitas maka kotoran atau kontaminan yang terdapat di dalam air akan berpindah tempat ke makanan yang kita olah.

Salah satu tujuan proses pengolahan adalah untuk menurunkan mikrobial kontaminan yang secara tidak langsung akan meningkatkan masa simpannya. Untuk itu ada beberapa mikrobial yang digunakan sebagai indikator, yang biasa disebut sebagai mikrobial indikator. Menurut Ashbolt dkk. (2001), mikrobial indikator dan mikroorganisme indeks yang dapat memberikan efek terhadap kesehatan masyarakat dapat digolongkan menjadi 3, yaitu indikator proses, indikator kontaminan saluran pencernaan (*faecal indicator*), dan organisme indeks dan model. Adapun definisi untuk masing-masing adalah:

1. Indikator proses: kelompok organisme yang dapat menunjukkan efisiensi proses, seperti total bakteri heterotrof atau total coliform untuk perlakuan klorinasi
2. *Faecal indicator* adalah kelompok organisme yang mengindikasikan keberadaan mikrobial yang berasal dari saluran pencernaan, seperti grup bakteri coliform termotoleran atau *Escherichia coli*. Karena *E.coli* adalah mikrobial satu-satunya yang ada bersama-sama dengan patogen lain.
3. *Organisme indeks dan model* adalah sekelompok atau species yang mengindikasikan keberadaan patogen, seperti *E. coli* yang digunakan sebagai

indeks untuk keberadaan *Salmonella* sp dan colifage F-RNA sebagai model untuk virus yang menyerang saluran pencernaan manusia

Untuk itu terdapat satu parameter penting dalam pengolahan bahan pangan, yaitu mikrobiologi air. Salah satu bidang dalam mikrobiologi pangan yang membahas tentang kualitas mikrobiologi air. Air merupakan suatu komponen yang tidak mempunyai komposisi nutrisi yang baik untuk menunjang pertumbuhan mikrobia, namun dapat digunakan sebagai media penyebaran yang baik. Mulai dari mikrobia patogen, pembusuk hingga perusak. Mikrobia patogen yang dapat ditemukan di dalam air meliputi: *vibrio cholera*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhosa*, *S. paratyphi*, virus polio, dan hepatitis serta *Entamoeba histolytica*.

Jumlah dan jenis kontaminan pada air dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti:

1. Sumber air
2. Senyawa organik di dalam air
3. Senyawa beracun di dalam air
4. Faktor fisik (suhu, pH, tekanan osmotik, tekanan hidrostatik, aerasi, dan penetrasi sinar matahari)
5. Jenis mikro organisme yang ada di dalam air

Metode yang dapat digunakan untuk menentukan kualitas air adalah:

1. Metode MPN (*Most Probable Number*)

Metode MPN merupakan metode pengukuran jumlah kontaminan di dalam air dengan metode perkiraan terdekat. Metode dilakukan dengan cara menghitung jumlah mikrobia yang mampu memfermentasi laktosa dan menghasilkan gas. Metode MPN berlangsung dalam 3 tahap, yaitu:

- a. Uji penduga (*presumptive test*)
- b. Uji penguat (*Confirmed test*)
- c. Uji kepastian atau pelengkap (*Complete test*)

Metode MPN sangat cocok digunakan untuk menghitung cemaran dengan jumlah yang sangat kecil, seperti pada sampel air kemasan atau sampel hasil klorinasi. Uji penduga digunakan untuk menduga jumlah mikrobia koli dengan menggunakan kombinasi angka yang dihasilkan dari jumlah tabung yang positif dan jumlah tabung yang negatif. Uji

penduga ini tidak mencerminkan angka yang sesungguhnya namun digunakan untuk menduga dengan tingkat kepercayaan tinggi, yaitu pada taraf signifikansi 5%.

Uji penguat digunakan untuk menentukan apakah bakteri yang ada pada tabung yang positif adalah bakteri yang berasal dari fekal sedangkan uji pelengkap digunakan untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh merupakan *ESchericia coli*. Tabung yang positif diambil sampelnya kemudian ditumbuhkan pada media *Mic Concey Agar* (MCA). Uji ini bisa ditindaklanjuti dengan pengamatan morfologi, pengecatan spora, dan pengecatan gram.

2. Metode Membran Filter

Metode ini sempat digunakan di Rusia dan Jerman. Metode ini dinilai praktis karena dapat digunakan langsung pada pabrik. Sejumlah air dilewatkan melalui membran filter yang kemudian ditempelkan pada medium Endo Agar dan diinkubasi. Kelemahan dari metode ini adalah ketidakmampuannya untuk membuktikan kemampuan isolat untuk memproduksi gas dari laktosa. Beberapa organisme dalam kelompok koliform mampu tumbuh dalam media Endo Agar namun tidak dapat menggunakan laktosa, tidak mampu memfermentasi laktosa menjadi gas, dan produksi indol negatif pada suhu 44.5 °C.

3. Metode substrat spesifik (*Defined substrate methods*)

Media tanpa agensia selektif namun berisi enzim spesifik yang memberi kesempatan bagi bakteri tertentu untuk hidup. Pada kasus menumbuhkan koliform atau *E. coli*, didasarkan pada kemampuan *E. coli* untuk menghasilkan enzim β galaktosidase, tidak menghasilkan enzim urease, dan menghasilkan enzim β glukuronosidase. International standards Organization (ISO) juga telah mengembangkan metode ini untuk identifikasi koliform (ISO/FDIS 1998, 1999).

B. Tujuan Praktikum

Menentukan kualitas mikrobiologi air pada sampel air dan bahan pangan

C. Alat, Bahan, dan Cara Kerja

Metode 1. Metode MPN (*Most Probable Number*)

Alat:

- a. Sampel air minum (air minum kantin, air mineral, air isi ulang, dan air dalam kemasan)
- b. Sembilan tabung reaksi berisi media LB (*lactose broth*) 10 ml dan tabung durham
- c. BTB (Bromothymol Blue) 10%
- d. Pipet mikro
- e. Bunsen
- f. Rak tabung
- g. Kapas
- h. Inkubator

Cara kerja:

- a. Siapkan medium LB + BTB (3-5 tetes) + tabung Durham (terbalik) yang telah disterilkan
- b. Buat seri pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3}
- c. Masukkan 1 ml sampel 10^{-1} dalam 3 seri tabung, 10^{-2} dalam 3 seri tabung, dan 10^{-3} dalam 3 seri tabung
- d. Inkubasi tabung pada suhu 37°C selama 1 hari.
- e. Amati perubahan yang terjadi. Tabung dikatakan positif jika ada perubahan warna medium dari hijau ke kuning serta ada gas yang terperangkap di dalam tabung Durham. Jika tidak ada perubahan, maka inkubasi bisa dilakukan 2 hari lagi dan dilakukan pengamatan yang sama
- f. Hasil pengamatan akan memberikan 3 kombinasi angka yang bisa dicocokkan dengan tabel MPN. Misalnya untuk kombinasi 321 maka jumlah bakteri coliform adalah $1,5 \times 10^2$ sel/ml

Nomor tabung yang positif			Indeks MPN per 100 ml	95% batas kepercayaan	
10 ml	1 ml	0,1 ml		terendah	tertinggi
0	0	1	3	< 0,5	9
0	1	0	3	<0,5	13

1	0	0	4	<0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Uji Penguat (Confirmed test)

Alat dan Bahan:

- a. Tabung dari uji penduga yang positif
- b. Medium EMBA atau ENDO Agar
- c. Ose
- d. Cawan Petri
- e. Bunsen

f. Inkubator

Cara kerja:

- a. Siapkan medium agar dalam cawan petri yang telah steril dan siap digunakan
- b. Inokulasikan isolat dari tabung yang positif ke dalam medium pada cawan petri dengan metode goresan. Buatlah goresan untuk kontrol (*E. coli*).
- c. Inkubasi pada suhu 37 oC selama 1 hari
- d. Uji dikatakan positif jika terdapat koloni berwarna hijau metalik dengan pusat berwarna hitam pada media EMBA atau koloni merah hitam metalik pada medium ENDO Agar
- e. Jika positif, maka ambil 1 goresan dan inokulasikan pada medium NA agar miring

Uji Pelengkap (*Complete test*)

Alat dan Bahan

- a. Biakan bakteri dalam NA miring dari uji penguat
- b. Gram A, B, C, dan D
- c. Aquades steril
- d. Alkohol 70%
- e. Ose
- f. Gelas Objek
- g. Mikroskop

Cara Kerja:

Kultur yang positif pada uji penguat diambil 1 ose untuk dicat Gram. Apabila ternyata Gram Negatif, maka isolat positif *E.coli*. Adapun untuk prosedur pengecatan gram adalah:

- a. Bersihkan gelas preparat menggunakan alkohol 70%
- b. Teteskan aquades steril atau larutan isotonis ke dalam gelas preparat
- c. Masukkan 1 ose isolat dan ratakan hingga membentuk area dengan diameter kurang lebih 1 cm
- d. Keringkan dengan hair drier dan fiksasi
- e. Teteskan gram A sebanyak 2 tetes dan biarkan selama 2 menit

- f. Cuci dengan air mengalir dan keringanginkan
- g. Teteskan Gram B dan biarkan selama 1-2 menit
- h. Cuci dengan air mengalir dan keringanginkan
- i. Teteskan Gram C dan biarkan selama 30 detik
- j. Cuci dengan air mengalir dan keringanginkan
- k. Teteskan Gram D dan biarkan selama 1 menit
- l. Cuci dengan air mengalir dan keringanginkan
- m. Amati di bawah mikroskop. Hasil positif jika Gram negatif dan *E. coli* akan berbentuk batang hingga batang pendek

Metode Perhitungan dengan cara Plating

Alat dan Bahan:

- a. Sampel air
- b. Media VRBA untuk menghitung koliform
- c. Media NA atau PCA
- d. Bunsen
- e. Pipet
- f. Larutan isotonis (NaCl 0,85%)

Cara Kerja:

- a. Buat seri pengenceran sampel 10^0 , 10^{-1} , dan 10^{-2} . Buat perkiraan tentang jumlah mikrobia yang mungkin ada di dalam sampel.
- b. Inokulasikan pada media VRBA dengan cara pour plate atau PCA dengan cara spread plate
- c. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 2 hari
- d. Lakukan pengamatan dan lakukan penghitungan jumlah sel
- e. Tentukan jumlah cemaran atau jumlah bakteri koli yang ada pada sampel

D. Lembar Kerja

MIKROBIOLOGI AIR

Kelompok :

Nama Anggota :.....

.....

.....

.....

No	Sampel	Jumlah koloni pada pengenceran			Jumlah sel (CFU/ml)
		10^0	10^{-1}	10^{-2}	
1	Sampel air minum kantin				
2	Sampel air minum dalam kemasan				
3	Sampel air minum isi ulang				
4	Sampel air es				

Surakarta, 2024

Mengetahui

Ko-Asisten

(.....)

ACARA 2

PENGARUH PROSES PENGOLAHAN TERHADAP KUALITAS MIKROBIA

A. Pendahuluan

Pertumbuhan mikrobia sangat dipengaruhi oleh lingkungan. Untuk memperpanjang masa simpan suatu produk pangan, hal yang bisa dilakukan adalah dengan mengendalikan faktor lingkungannya. Adapun faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan mikrobia adalah suhu, pH, cahaya, tekanan osmotik, dan keberadaan senyawa antimikrobial dalam bahan pangan.

Berdasarkan suhu optimal untuk pertumbuhannya, mikrobia digolongkan menjadi kelompok psikrofil, mesofil, termofil dan psikrotrof. Beberapa jenis mikrobial pembusuk dan patogen berada pada suhu menengah (mesofil) sehingga beberapa jenis bahan pangan akan lebih awet apabila disimpan pada suhu rendah atau akan mati apabila dipanaskan.

Keasaman atau pH lingkungan juga mempengaruhi kemampuan tumbuh mikrobial. Berdasarkan pH optimum pertumbuhannya, mikrobial dibedakan menjadi asidofil (mikrobial yang mempunyai kemampuan untuk tumbuh pada pH rendah); alkalofil (cenderung menyukai pH basa) dan neutrofil (suka pada pH netral). Sebagian besar mikrobial perusak dan pembusuk tergolong dalam neutrofil sehingga beberapa jenis bahan pangan diawetkan dengan cara menurunkan pHnya. Pengawetan bahan pangan dengan pH basa tidak terlalu disukai karena penerimaan konsumen yang relatif rendah.

Keberadaan cahaya cenderung merusak bahan pangan. Terutama untuk bahan yang mudah mengalami kerusakan karena adanya cahaya seperti vitamin C, antioksidan, lemak atau lipid, dan vitamin yang lain. Mikrobial cenderung tidak tahan hidup pada tekanan osmotik yang tinggi. Lingkungan untuk pertumbuhan dapat ditingkatkan tekanannya dengan cara menambahkan gula atau garam serta dikombinasikan dengan pengeringan.

Teknik pengolahan yang ditujukan untuk menurunkan jumlah mikrobial dengan cara yang alami banyak dilakukan. Ada teknik yang sengaja dilakukan untuk menurunkan jumlah mikrobial dalam bahan pangan dalam jangka waktu yang lama, yaitu dengan cara menambahkan senyawa antimikrobial atau bahan kimia yang

mempunyai aktivitas sebagai antimikrobia, seperti asam asetat, asam benzoat, asam sitrat, asam bromat, dan asam organik yang lain. Tidak ada satupun jenis asam organik yang mampu menghambat semua jenis mikrobia. Sehingga untuk menghambat jenis mikrobia tertentu harus menggunakan jenis asam organik yang tepat. Beberapa di antaranya menggunakan satu atau lebih jenis asam organik untuk meningkatkan efektivitasnya.

B. Tujuan Praktikum

Menentukan pengaruh proses pengolahan dan penyimpanan terhadap kualitas mikrobiologi sari buah jeruk. Adapun proses pengolahan yang akan dipelajari pengaruhnya dalam praktikum kali ini adalah pengaruh suhu penyimpanan, pengaruh penambahan asam organik (asam benzoat atau asam sitrat) terhadap kualitas mikrobiologi sari buah jeruk.

C. Alat dan Bahan Praktikum

- a. Sari buah jeruk 50 ml
- b. Asam sitrat 1%
- c. Asam benzoat 0,5%
- d. Media PCA
- e. Larutan isotonis (NaCl 0,85%)
- f. Bunsen
- g. Inkubator
- h. Rak tabung reaksi
- i. Pipet mikro

D. Cara kerja

- a. Siapkan sari buah jeruk sebanyak 6 x @ 50 ml dalam erlenmeyer 100 ml
- b. Bagi masing-masing erlenmeyer dengan perlakuan sebagai berikut:
 - Kontrol negatif (sari buah jeruk segar)
 - Sari buah jeruk tanpa perlakuan (kontrol positif)
 - Sari buah jeruk + 1% asam sitrat + simpan suhu kamar
 - Sari buah jeruk + 1% asam sitrat + simpan dalam refrigerator
 - Sari buah jeruk + 0,5% asam benzoat + simpan suhu kamar
 - Sari buah jeruk + 0,5% asam benzoat + simpan dalam refrigerator

- c. Simpan semua perlakuan sari buah jeruk sesuai perlakuan selama 1 hari kecuali sari buah jeruk segar
- d. Lakukan penghitungan jumlah mikrobia mesofil dengan medium PCA dengan sistem pour plate.
- e. Plating dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran kemudian diplating untuk masing-masing pengenceran sebanyak 2 kali (duplo)
- f. Inkubasi dilakukan selama 2 hari
- g. Hitung dan tentukan jumlah sel

E. Lembar Kerja

ACARA 2

PENGARUH PROSES PENGOLAHAN TERHADAP KUALITAS
 MIKROBIOLOGI SARI BUAH JERUK

Kelompok :
 Anggota :

No	Sampel	Jumlah koloni pada pengenceran			Jumlah sel (CFU/ml)
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	
1	Kontrol (simpan suhu kamar 1 hari)				
2	Sari buah jeruk segar				
3	Sari buah jeruk + 1% asam sitrat simpan suhu kamar				
4	Sari buah jeruk + 1% asam sitrat simpan suhu refrigerator				
5	Sari buah jeruk + 0,5% asam benzoat simpan suhu kamar				
6	Sari buah jeruk + 0,5% asam benzoat simpan suhu refrigerator				
7	Sari buah jeruk simpan suhu dingin 1 hari				
8	Sari buah jeruk simpan suhu beku 1 hari				
9	Sari buah jeruk + 0,5% asam benzoat simpan suhu refrigerator				

Surakarta, 2024
 Mengetahui
 Ko-Asisten

(.....)

ACARA 3

PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIMIKROBIA

A. Pendahuluan

Pengujian aktivitas antimikrobia merupakan jalan bagi penemuan obat-obatan tradisional dan juga yang telah dikembangkan secara modern. Pengujian ini digunakan untuk menentukan dosis yang tepat untuk pengobatan. Pengujian aktivitas antimikrobia juga berperan dalam pengembangan senyawa antimikrobia dalam proses pengolahan pangan. Beberapa bahan pangan mengandung senyawa antimikrobia alami, seperti gingerol pada jahe, curcumin pada kunyit, minyak atsiri pada daun cengkeh atau daun jeruk, dan lain-lain.

Kenyataan bahwa ekstrak tanaman mempunyai aktivitas sebagai antimikrobia tidak dapat dipungkiri lagi. Banyak peneliti yang melakukan penggalian tentang senyawa antimikrobia pada beberapa jenis ekstrak tanaman. Metode pengujian juga telah dikembangkan, metode yang paling banyak dipakai adalah metode difusi baik pada media padat maupun media cair. Sedangkan untuk pengujian antijamur biasanya dilakukan dengan metode pangan beracun (*poisoned food technique*). Pengujian aktivitas antimikrobia biasanya didasarkan pada lama waktu yang dibutuhkan untuk membunuh mikrobia atau penentuan konsentrasi yang dapat membunuh mikrobia target.

Metode difusi agar merupakan metode pengujian aktivitas antimikrobia yang dikembangkan sejak tahun 1940. Sampai dengan saat ini merupakan metode standar yang selalu dilakukan untuk menguji aktivitas antimikrobia. Metode ini masih diakui sebagai metode standar oleh beberapa lembaga pengujian skala internasional sebagai metode yang akurat, baik untuk bakteri dan yeast. Untuk beberapa jenis bakteri, telah dikembangkan metode yang lebih canggih menggunakan media spesifik, seperti *Streptococci*, *Haemophilus influenza*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* dan *Neisseria meningitides*. Spesifisitas teknik tidak hanya pada jenis media saja, namun juga lama waktu inkubasi dan kriteria penghambatannya.

Metode difusi agar dilakukan dengan cara menumbuhkan mikrobia target ke dalam cawan petri, kemudian diletakan kertas saring yang telah direndam dengan senyawa antimikrobia pada konsentrasi tertentu di atas permukaan agar. Agar

bersama kertas disk diinkubasi bersama pada suhu yang sesuai. Senyawa antimikrobia yang ada dalam kertas akan berdifusi ke agar dan menghambat pertumbuhan mikrobia target. Kemampuan penghambatan diukur dengan mengukur diameter zona jernih. Penghambatan pertumbuhan mikrobia tidak selalu berakhir pada kematian sel, oleh karena itu pengujian ini tidak dapat digunakan untuk menentukan apakah senyawa antimikrobia itu termasuk bakterisidal ataukah bakteristatik. Metode difusi agar juga tidak dapat digunakan untuk menentukan MIC (*minimum inhibitory concentration*), karena jumlah senyawa antimikrobia yang berdifusi ke dalam agar, tidak dapat diukur. Nilai MIC dapat diduga menggunakan metode difusi agar untuk beberapa jenis mikroorganisme dan antibiotik dengan cara membandingkan zona penghambatan dengan algoritma (Nijs *et al.*, 2000).

Metode difusi agar mempunyai banyak kelebihan dibandingkan dengan metode yang lain karena sederhana, biaya rendah, kemudahan untuk mendapatkan sejumlah mikrobia dan senyawa antimikrobia serta tingkat kemudahan dalam menginterpretasikan data. Metode gradien antimikrobia merupakan modifikasi metode difusi agar yang bertujuan untuk menentukan MIC. Metode gradien ini dilakukan dengan cara membuat senyawa antimikrobia dengan konsentrasi yang semakin lama semakin besar dan kemudian diuji dengan metode difusi agar.

B. Tujuan Praktikum

Menentukan zona penghambatan ekstrak bagian tanaman terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* atau *Saccharomyces sp.*

C. Alat dan Bahan Praktikum

Cawan petri

Kertas cakram (*paper disc*)

Biakan *E.coli*

Biakan *S. aureus*

Biakan *Saccharomyces sp.*

Media NA

Ekstrak bagian tanaman/minyak atsiri

Asam sitrat

Asam benzoat

Cara kerja:

- Siapkan petri yang telah diberi dengan media NA hard (agar 1,5%).
- Kemudian, tuangkan isolat/biakan mikrobia target ke dalam NA soft (0,9% agar) dan homogenkan
- Tuang ke atas NA hard dan inkubasi pada suhu refrigerator selama 30 menit
- Letakkan kertas cakram yang telah direndam dalam senyawa antimikrobia (telah diketahui konsentrasinya) di bagian atas permukaan agar
- Tekan kertas cakram agar menempel di permukaan agar
- Inkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam
- Ukur diameter zona hambat (mm) kemudian bandingkan dengan tabel sensitivitas antibiotik.

Tabel sensitivitas antibiotik

Antibiotik	Diameter zona jernih (mm)		
	Resisten	Intermediat	peka
Tetrasiklin	14	15-18	19
Siprofloksasin	15	16-20	21
Enoxasin	14	15-17	18
Eritromisin	13	14-22	23
Penisilin			
Staphylococci	28		29
Oxasilin			
Staphylococci	10	11-12	13
Tobramisin	12	13-14	15
Sefriaxon	13	14-20	21
Kanamisin	13	14-17	18
Klindamisin	14	15-20	21
Piperasilin			
Gram negatif	17	18-20	21
Ampisilin			
Gram negatif enteric	13	14-16	17
Staphylococci	28		29

Cara menginterpretasikan:

- Ukur diameter zona hambatan (zona jernih)
- Apabila diperoleh zona hambat suatu bakteri berdiameter 26 mm untuk eritromisin, maka dapat diinterpretasikan bahwa bakteri tersebut peka terhadap eritromisin

- Jika diperoleh zona jernih kurang dari 13 mm, maka bakteri tergolong resisten

D. Lembar Kerja

No	Konsentrasi ekstrak	Diameter zona jernih (mm)	Kategori
1	50 ppm		
2	100 ppm		
3	200 ppm		
4	400 ppm		